

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07051100 A**

(43) Date of publication of application: **28.02.95**

(51) Int. Cl

C12Q 1/68

(21) Application number: **05216843**

(22) Date of filing: **10.08.93**

(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**

(72) Inventor: **NAKAGAWA TOMOKO
MUKAI HIROYUKI
SHIMADA MASAMITSU
FUJINO KIMIYA
KATO IKUNOSHIN**

**(54) METHOD FOR DETECTING BACTERIUM OF
GENUS LACTOBACILLUS**

(57) Abstract:

PURPOSE: To rapidly carry out amplification and detection of nucleic acid of a bacterium which belongs to the genus Lactobacillus by catching bacteria of the genus Lactobacillus as pretreatment of PCR on a filter and cleaning the bacteria.

CONSTITUTION: Bacteria of the genus Lactobacillus are caught on a filter as a pretreatment of PCR using DNA of bacterium of the genus Lactobacillus in a liquid sample containing bacteria (e.g. Lactobacillus hiochii bacterium)

of the genus Lactobacillus as a template and the bacteria are cleaned. There, PCR inhibitor in the liquid sample is removed and amplification of the nucleic acid of the bacterium of the genus Lactobacillus is promoted.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-51100

(43)公開日 平成7年(1995)2月28日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号

Z N A Z 9453-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1 FD (全14頁)

(21)出願番号 特願平5-216843

(22)出願日 平成5年(1993)8月10日

(71)出願人 591038141

賣酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 中川 朋子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賣酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 向井 博之

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賣酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 篠田 雅光

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賣酒造
株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ラクトバチルス属細菌の検出方法

(57)【要約】

【目的】 ラクトバチルス属細菌、特に火落菌の、従来法より更に迅速かつ高感度な検出方法を提供する。

【構成】 プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中の該細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有するラクトバチルス属細菌の検出方法。該洗浄工程は、捕獲したラクトバチルス属細菌に付着している後工程の増幅方法の阻害物質を洗去するためのものであり、洗浄液としては滅菌水、緩衝液が例示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中のラクトバチルス属細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有することを特徴とするラクトバチルス属細菌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属細菌の検出方法に関し、更に詳細には PCR 法を用いた迅速かつ高感度な火落菌等のラクトバチルス属細菌の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】清酒の火落ちを起こす微生物（火落菌）に関する研究は、北原や野白、百瀬によって分類学的研究が行われている〔日本醸造協会雑誌、第65巻、第715～803頁、(1970)〕。火落菌はラクトバチルス属に属し、メバロン酸の要求性から真性火落菌と火落性乳酸菌に分類される。真性火落菌には、ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (*Lactobacillus heterohiochii*) とラクトバチルス ホモヒオチイ (*Lactobacillus homohiochii*) があり、火落性乳酸菌には、ラクトバチルス ジャポニカス (*Lactobacillus japonicus*)、ラクトバチルス プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*) 等が挙げられる。火落菌の検出は、火落菌検出培地 SI 培地（日本醸造協会）が市販されており、本培地を用いた培養法により検出が行われている。しかし、この検出法には7日間以上の日数を要する。したがって、火落菌の迅速高感度検出法が望まれている。一方微生物やウイルスの迅速高感度検出法として PCR 法〔メソッズ インエザイモロジー (Methods in Enzymology)、第155巻、第335～350頁 (1987)〕がある。PCR 法は、検出する生物の遺伝子の特異的配列を指数的に増幅させる方法であり、PCR 法を用いるには検出する生物の遺伝子情報が必要である。

【0003】ラクトバチルス属細菌の r RNA 遺伝子について、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス デルブルエキイ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス プランタルム、及びラクトバチルス ビリデセンス (*Lactobacillus viridescens*) の 5 S r RNA 遺伝子の塩基配列が明らかにされており〔ジャーナル オブ モレキュラー エボルーション (Journal of Molecular Evolution)、第8巻、第143～153頁 (1976)、ヌクレイン アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第17巻、第4873頁 (1989)、同第16巻、第10938頁 (1988)、同第8巻、第979～987頁 (1980)〕、ラクトバチルス カゼイ、ラクトバチ

ルス カンドレリ (*Lactobacillus kandleri*)、ラクトバチルス マイナー (*Lactobacillus minor*)、ラクトバチルス コンフサス (*Lactobacillus confusus*)、ラクトバチルス ビリデセンス、ラクトバチルス カテナホルメ (*Lactobacillus catenaforme*)、及びラクトバチルス ビツリナス (*Lactobacillus vitulinus*) の 16 S r RNA 遺伝子の塩基配列が明らかにされている〔ジャーナル オブ バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)、第171巻、第6455～6467頁 (1989)、ヌクレイン アシッズ リサーチ 第18巻、第3401～3402頁 (1990)、システムティック アンド アプライド ミクロバイオロジー (Systematic and Applied Microbiology)、第12巻、第145～149頁 (1989)〕。そして土屋らはラクトバチルス ブレビスの 5 S r RNA 遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを作製し、PCR 法を用いたビール中のラクトバチルス ブレビスの検出方法を報告している〔日本醸造協会雑誌、第86巻、第720頁 (1991)〕。しかし、5 S r RNA の塩基配列は微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス ブレビス以外の微生物をも誤って検出してしまう可能性がある。また、16 S r RNA についても同様に、微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス属細菌を特異的に検出する目的には不適当である。

【0004】一方、16 S r RNA 遺伝子と 23 S r RNA 遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子は、微生物種に特異的な塩基配列を有することが知られている。本発明者らは特願平4-113154号明細書中で各種のラクトバチルス属細菌のスペーサー領域の塩基配列を決定し、該スペーサー領域をプライマーを用いて増幅することによってラクトバチルス属細菌を検出する方法を開示している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ラクトバチルス属細菌に特異的な遺伝子を用いてラクトバチルス属細菌、特に火落菌を PCR 法で検出する方法において、更に迅速かつ高感度な検出方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明はラクトバチルス属細菌の検出方法に関する発明であって、プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中のラクトバチルス属細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有することを特徴とする。

【0007】ラクトバチルス（以下、L. と略称する）属細菌の r RNA をコードする DNA は、16 S r RNA - スペーサー領域 - 23 S r RNA - スペーサー領域 - 5 S r RNA の各 DNA 配列で構成されている。本発

明者らは特願平4-113154号明細書に記載のごとく、下記表1に示した13種類のL. 属細菌のrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNAをコードしているDNA配列の一部を明らかにし、次にL. 属細菌一*

*般に共通なDNA配列及びそれぞれの種に特異的なDNA配列を見出している。

【0008】

【表1】

表 1

	菌 株	培地	培養温度
(真性火落菌)			
L. ヘテロヒオチイ	IFO13118	SI	30°C
	IFO13119	SI	30°C
	JCM1198	SI	30°C
L. ホモヒオチイ	IFO13120	SI	30°C
	IFO13121	SI	30°C
	JCM1199	SI	30°C
(火落性乳酸菌)			
L. ジャポニカス	IAM10068	803	37°C
L. ブランタルム	IAM1216	803	37°C
L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス (rhamnosus)	IFO3532	804	37°C
L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ	IFO3533	804	37°C
L. スピーシーズ	IFO3954	804	37°C
(一般乳酸菌)			
L. ブレビス	IFO13110	804	30°C
(火落菌単離株)			
	F-1	SI	30°C

【0009】培地組成：

S I : S I 培地 (日本醸造協会) 5 g、エタノール 10 ml、蒸留水 90 ml

8 0 3 : 0. 5% ポリペプトン、0. 5% イーストエキストラクト、0. 5% グルコース、0. 2% ラクトース、0. 05% ツィーン(Tween) 80、0. 1% MgSO₄/7H₂O、pH 6. 8~7. 0

8 0 4 : 0. 5% ペプトン、0. 5% イーストエキストラクト、0. 5% グルコース、0. 1% MgSO₄/7H₂O、pH 6. 6~7. 0

【0010】更に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR法を行うために、L. 属細菌に共通なDNA配列及び種に特異的なDNA配列の特定領域DNAをPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプロ

※イマーを合成している。本発明者らは更に研究を進め、L. 属細菌を含有する液体試料中のL. 属細菌DNAを錆型としてPCRを行い、PCRの前処理としてL. 属細菌をフィルターに捕獲し、次に該細菌を洗浄することにより液体試料中のPCR阻害物質が除去され、L. 属細菌DNAの特定領域が効率よく増幅、検出されることを見出し本発明を完成した。

30 【0011】以下、具体的に本発明を説明する。16S rRNA及び23S rRNAをコードする遺伝子は微生物間でよく保存されていることが知られている(表2~表5)。

【0012】

【表2】

表 2

R16-1の配列: 5' -C T T G T A C A C A C C G C C C G T C A-3'

L. カゼイ	- - - - -
バチルス ズブチリス (Bacillus subtilis)	- - - - -
エシェリヒア コリ (Escherichia coli)	- - - - -
マイコバクテリウム ボビス (Mycobacterium bovis)	- - - - -
ハロバクテリウム ハロビウム(Halobacterium halobium)	- - - C - - - - -
マイコプラズマ カプリコラ	- - - 50 - - - - -

ム(Mycoplasma capricolum)	- - - - -
シュードモナス アエルギノ	- - - - -
サ(Pseudomonas aeruginosa)	- - - - -
サーマス サーモフィラス	- - - - -
(Thermus thermophilus)	- - - - -
ハロコッカス モールアエ	- - - C - - - - -
(Halococcus morrhuae)	- - - - -
ストレプトミセス リビダン	- - - - -
ス(Streptomyces lividans)	- - - - -
ヘリオバクテリウム クロラ	- - - - -
ム(Heliobacterium chlorum)	- - - - -
フラボバクテリウム ヘパリ	- - - - -
ナム(Flavobacterium heparinum)	- - - - -

【0013】

【表3】

表 3

R16-2の配列: 5'-G T G C G G C T G G A T C A C C T C C T-3'

L. カゼイ	N N N N N N N N - - - - -
バチルス ズブチリス	- - - - -
エシェリヒア コリ	C - - - T - - - - -
マイコバクテリウム ボビス	- - - - -
ハロバクテリウム ハロビ	C - - - - -
ウム	-
マイコプラズマ カプリコ	- - - - A - - - - -
ラム	-
シュードモナス アエルギ	C - - - - -
ノサ	-
サーマス サーモフィラス	- - - - -
ハロコッカス モールアエ	C - - - - -
ストレプトミセス リビダ	- - - - -
ンス	-
ヘリオバクテリウム クロ	- - - - -
ラム	-
フラボバクテリウム ヘパリ	- N N N N N N N - - - - -
ナム	-

【0014】

【表4】

表 4

R23-1Rの配列 : 3'-C^C_T T A C^G_C G A A C C C G T G A T C C T C-5'

R23-1Rの相補配列 : 5'-G^G_A A T G^C_G C T T G G C A C T A G G A G-3'

バチルス ズブチリス	- G - - - C - - - - - - - - - - - - - - - -
エシェリヒア コリ	- G - - - C - C - - - - G - C A - - -
マイコバクテリウム ボビス	- G - - - C - - - - - - T C G A - - -
ハロバクテリウム ハロビウム	- G - - A G - - C - - - T - G G A T G C
マイコプラスマ カブリコラム	- A - - - C - - - - A - A A T - - -
ショードモナス アエルギノサ	- G - - - C - - - - - G - C A - - -
サーマス サーモフィラス	- G - - - C - - C - - - C C * - - -
ハロコッカス モールアエ	- A - - A G - - - - G - C A - - -

【0015】

【表5】

表 5

R23-2Rの配列 : 3'-C T T G T A G A T T C A T G G G C C T-5'

R23-2Rの相補配列 : 5'-G A A A C A T C T A A G T A C C C G G A-3'

バチルス ズブチリス	- -
エシェリヒア コリ	- - - - - - - - - - - - - - - C - -
ハロバクテリウム ハロビ ウム	- - - G - - - - C - - - - G G C C -
ショードモナス アエルギ ノサ	- - - - - - - - - - T - -
サーマス サーモフィラス	- - - - - - C - - - - A - -
ハロコッカス モールアエ	- - - - - - C - - - - G - C -

* ことができる。

【0016】上記表2～表5は原核生物rRNA遺伝子の保存されている塩基配列、及びそれから選定したプライマーの塩基配列を示すものであり、表2及び表3は16S rRNA遺伝子の、表4及び表5は23S rRNA遺伝子の、それぞれ保存されている塩基配列、及びそれから選定したプライマーの塩基配列を表す。表2～表5ではいずれも、保存されている塩基を-で、異なる塩基をその塩基の記号で、欠損している塩基を*で、同定されていない塩基をNで示した。

【0017】例えば、配列表の配列番号1で表されるR16-1プライマーと配列番号4で表されるR23-2Rプライマーの組合せ、配列番号2で表されるR16-2プライマーと配列番号3で表されるR23-1Rの組合せでL. 属細菌のスペーサー領域をPCR法で増幅することができる。

【0018】これらのプライマーはDNA合成機により合成することができ、HPLC等で適宜精製して使用す

40

* 50

PCR法については、タックDNAポリメラーゼを含む遺伝子增幅キット及び自動遺伝子增幅装置が宝酒造社から市販されている。PCR法により増幅されたスペーサー領域を含む断片を含む塩基配列を決定するためには、例えば増幅断片をM13ファージベクターにクローニングし、ファージDNAを調製した後、サンガーファイブ法により決定することができる。

【0020】このようにして決定したスペーサー領域の塩基配列より、L. 属細菌のそれぞれの特異的な領域、あるいは共通する領域を特定することができる。本発明者らは、前記明細書において13種類のL. 属細菌のスペーサー領域の塩基配列を明らかにし、配列表の配列番号5～13に示されるL. 属細菌に特異的な塩基配列を決定している。配列表の配列番号5はL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199、配列番号6はL. ヘテロヒオチイIFO1311

8、L. ヘテロヒオチイ IF013119、L. ホモヒオチイ IF013120、及びL. ホモヒオチイ IF013121、配列番号7はL. ジャボニカス IAM10068、配列番号8はL. ブランタルム IAM1216、配列番号9はL. カゼイサブスピーシーズラムノサス IF03532、配列番号10はL. カゼイサブスピーシーズカゼイ IF03533、配列番号11はL. スピーシーズIF03954、配列番号12はL. プレビス IF013110、配列番号13は清酒より新たに分離した火落菌分離株F-1のrRNAをコードしている遺伝子の塩基配列である。

【0021】得られた塩基配列を基にそれぞれのL. 属*

表 6

10 【0022】

【表6】

6

菌 株		特異的配列	特異的プライマー
L. ヘテロヒオチイ	IF013118	配列番号 6	LAM3R (配列番号15)
	IF013119	" 6	LAM3R (" 15)
	JCM1198	" 5	LAK4R (" 14)
L. ホモヒオチイ	IF013120	" 6	LAM3R (" 15)
	IF013121	" 6	LAM3R (" 15)
	JCM1199	" 5	LAK4R (" 14)
L. ジャボニカス	IAM10068	" 7	LAJ3R (" 16)
L. ブランタルム	IAM1216	" 8	LAJ3R (" 16)
L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス	IF03532	" 9	LAC4R (" 17)
L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ	IF03533	" 10	LAC4R (" 17)
L. スピーシーズ	IF03954	" 11	LAB4R (" 18)
L. プレビス	IF013110	" 12	LAB4R (" 18)
火落菌単離株 F-1		" 13	LAF 1 (" 19)

【0023】具体的に説明すれば、配列表の配列番号20で表されるLAU1と配列番号14で表されるLAK4Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199の遺伝子が、LAU1と配列番号15で表されるLAM3Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ IF013118、13119とL. ホモヒオチイ IF013120、13121の遺伝子が、LAU1と配列番号16で表されるLAJ3Rのプライマー対によりL. ジャボニカス IAM10068とL. ブランタルム IAM1216の遺伝子が、LAU1と配列番号17で表されるLAC4Rのプライマー対によりL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IF03532とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IF03533の遺伝子が、LAU1と配列番号18で表されるLAB4Rのプライマー対によりL. スピーシーズ IF03954とL. プレビス IF013110の遺伝子が、配列番号19で表されるLAF1と配列番号21で表されるLA

※ U3Rのプライマー対により单離株F-1の遺伝子が特異的に増幅され、各菌を特異的に検出することができる。また、LAU1とLAU3Rのプライマー対によりこれらすべてのL. 属細菌の遺伝子が増幅され、これらの菌を検出することができる。なお、L. 属細菌においてはスペーサー領域にtRNAをコードする領域が挿入されている場合があるが、この場合でもこれらのプライマーを用いて増幅、検出できる。

【0024】増幅後のL. 属細菌DNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、及びサザンプロット法を用いて行うことができる。なお、スポット法、サザンプロット法の際は増幅領域内でプローブDNAを選択すればよい。

【0025】核酸の増幅方法、例えばPCR法のための前処理は次に例示する方法で行うことができる。

- (1) 液体試料をメンブランフィルターでろ過し、L. 属細菌を捕獲する。
- (2) 捕獲したL. 属細菌を必要に応じて培養する。

(3) 工程(2)を行った場合には該培養液をメンブランフィルターに通し、増殖したL. 属細菌を再び捕獲する。

(4) 工程(1)又は(3)で捕獲したL. 属細菌を洗浄する。

(5) プロティナーゼKで処理後99°Cで処理し、PCRに供する。

【0026】本発明における液体試料とは例えばL. 属細菌を含む酒類、例えば清酒、みりん、ワイン等であり、また、L. 属細菌を含む培地等である。

【0027】工程(1)で使用するメンブランフィルターとしては、L. 属細菌を捕獲できるものであれば何でもよい。メンブランフィルターの材質としては例えばポリフッ化ビニリデン、ニトロセルロース、親水性ポリエーテルスルホンが挙げられるが、ポリフッ化ビニリデンが好適である。メンブランフィルターの孔径はL. 属細菌を捕獲できるものであればよく、具体的には0.1～0.8μm程度である。メンブランフィルターの直径は特に限定されないが、例えば試料300mlを用いる場合は13～47mm程度のものを使用すればよく、ろ過時間の点から47mmが好適であるが、13mm及び25mmのメンブランフィルターを用いると工程(2)において、該メンブランフィルターを1.5ml容のマイクロチューブに直接納めることができて便利であり、通常、25mmのものが使用される。

【0028】工程(2)は液体試料中のL. 属細菌の数を増加させるため、あるいは生菌と死菌を区別するために行うものである。工程(2)で使用する培地としてはS I 培地が代表的であるが、アルコール濃度15%の純米酒1リットル中に酵母エキス10gとシステイン50mgを含み、pHは4.2～4.5に調整した培地(以下、改良培地と称す)を用いるとL. 属細菌の生育が早い上、核酸の增幅反応例えはPCRの反応阻害も低く、好適である。

【0029】工程(3)で使用するメンブランフィルターとしては工程(1)と同様のものが使用可能であるが、フィルター付遠心チューブを用いればそのまま遠心することにより簡便に濃縮することができる。

【0030】工程(4)の洗浄は例えば工程(1)又は*

* (3)を行った後、そのままメンブランフィルター上で行うことができる。すなわち、適量の洗浄液を工程

(1)又は(3)後のメンブランフィルターに直接添加し、次に遠心して濃縮すればよい。工程(4)で使用する洗浄液としては、L. 属細菌に付着した、核酸の增幅反応、例えはPCR法の阻害物質を除去できるものであればよく、滅菌水のほか、各種の緩衝液、例えはTE緩衝液(10mMトリス-HCl pH7.5、0.1mM EDTA)が挙げられる。

10 【0031】なお、工程(2)及び(3)は必要に応じて行えばよく、省略してもよい。省略する場合、工程

(4)は上記の方法によるほか、例えは以下のように行うことができる。すなわち、L. 属細菌を捕獲している工程(1)のメンブランフィルターをマイクロチューブ内で滅菌水に浸して、かくはんしてL. 属細菌を懸濁、洗浄し、次にそのL. 属細菌を含む滅菌水を再びメンブランフィルター、例えはフィルター付遠心チューブに通して、L. 属細菌を捕獲して、工程(5)に供すればよい。

20 【0032】また、PCRを行う際にdUTPとウラシル-N-グリコシラーゼ(UNG)を系に加えることにより、非特異的增幅を抑えることができ、更に精度の高い検出を行うことができる。

【0033】本発明者らは上記(1)～(5)の前処理を行い、清酒試料中のL. 属細菌をPCRにて検出した。その結果、試料300ml中に1個のL. 属細菌を含むサンプルでも再現性よく検出できた。一方、(4)の洗浄工程を省略した前処理では試料300ml中に100個のL. 属細菌を含むサンプルでも検出不可能であった。

30 【0034】また、本発明者らは更に精度の高い検出のために、各L. 属細菌のスペーサー領域から配列番号22～24にそれぞれ示される各L. 属細菌のスペーサー領域に特異的なプライマー、LA1198、LA F3R、LAC3Rを作成した。各L. 属細菌の分類と各プライマー及び前出のLAM3R(配列番号15)の対応を表7に示す。

【0035】

【表7】

表 7

分類	菌名	プライマー
真性火落菌	L. ヘテロヒオチイ JCM 1198	LA1198 (配列番号22)
	火落菌分離株P-a	
	L. ホモヒオチイ IF0 13120	
火落性乳酸菌	火落菌分離株F-1	LAF3R (配列番号23)
	L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IF0 3532	
	L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IF0 3533	

【0036】具体的に説明すれば、配列表の配列番号20で表されるLAU1と配列番号22で示されるLA1198のプライマー対で真性火落菌、例えばL. ヘテロヒオチイ JCM1198型と火落菌分離株P-a型の遺伝子が、LAU1とLAM3Rのプライマー対で真性火落菌、例えばL. ホモヒオチイ IF013120型の遺伝子が、LAU1と配列表の配列番号23で示されるLAF3Rのプライマー対で、火落性乳酸菌、例えば火落菌分離株F-1型の遺伝子が、LAU1と配列表の配列番号24で示されるLAC3Rのプライマー対で火落性乳酸菌、例えばL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IF03532型とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IF03533型の遺伝子が増幅される。

【0037】これらのプライマーは各火落菌のスペーサー領域の遺伝子の塩基配列と一致するため、ユニバーサルプライマーであるLAU3Rよりも更に感度、精度の高い検出が可能である。また、LA1198、LAM3R、LAF3R、及びLAC3Rの4種のプライマーを混合して用いることによりすべての型の火落菌を検出することができる。

【0038】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

* 【0039】実施例1

20 (1) フィルターの検討

清酒より分離されたL. 属細菌(伏見1-6株)をエタノール10%を含むSI液体培地10mlで30℃、24時間培養した。この培養液中の菌体の数を血球計算盤にて計数後、15%エタノールで希釈し、それぞれ100個/20ml、10個/20mlの溶液を4本ずつ調製し試料とした。フィルターとしてミリポア社のMF-ミリポアメンプランフィルター(セルロース混合エステル製、孔径0.45μm、直徑2.5mm)、ミリポア社のデュラポアメンプランフィルター(ポリフッ化ビニリデン製、孔径0.45μm、直徑2.5mm)、グルマンサイエンス社のスープアメンプランフィルター(親水性ポリスルホン製、孔径0.45μm及び0.2μmの2種類、いずれも直徑2.5mm)の4種類を選択、検討した。各試料をそれぞれのフィルターでろ過後、該フィルターを1.5ml容マイクロチューブ内で0.4mlの改良培地に浸し、10秒間かくはんした。次に、該改良培地全量を1%アガードを含むSI培地(エタノール10%)上にプレーティング後、該SI培地を重層し、更に1%アガードを重層し、30℃で4日間培養し、コロニーの数を調べた。表8に各試料のコロニー数を示す。

【0040】

【表8】

表 8

メンプランフィルター	100個/20ml	10個/20ml
------------	-----------	----------

MFミリポアメンプランフィルター	23	1
デュラポアメンプランフィルター	197	26
スープアメンプランフィルター (孔径0.45μm)	14	4
スープアメンプランフィルター	50	21
		1

【0041】すなわち、デュラポアメンブランフィルターが菌体の捕獲効率が優れており、L. 属細菌の検出に適していた。

【0042】(2) 清酒、SI培地、改良培地によるPCR反応阻害

試料として、15%アルコール濃度の吟醸生酒、10%エタノールを含むSI培地、10%の本醸造酒を含む改良培地を用いた。鋳型としてL. カゼイのゲノムDNA(最終濃度2ng/100μl)、プライマーとしてLAU1とLAU3R(最終濃度0.2μM)を使用し、各試料を適量すなわち、

吟醸生酒の場合 0、5μl、10μl、20μl、30μl、50μl/100μl

SI培地の場合 0、0.5μl、1μl、2μl、5μl、10μl/100μl

改良培地の場合 0、5μl、10μl、20μl、30μl、50μl/100μl

を含む100μlのPCR反応溶液[10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KC1、1.5mM MgCl₂、0.001%(W/V)ゼラチン、2.5ユニット/100μl タックポリメラーゼ]を調製した。各溶液にミネラルオイル(シグマ社)100μlを重層し、94°C0.5分、55°C1分、72°C1分、30サイクルの条件でDNAサーマルサイクラー(宝酒造社)を用いてPCRを行った。反応終了後、10μl分をヌシープ(Nusieve)3:1アガロース(FMC社)ゲルにて電気泳動を行い、エチジウムプロマイド染色して増幅されたDNAを観察した。その結果、吟醸生酒で20μl以上、SI培地で1μl以上、改良培地で50μl以上の添加でPCRの反応阻害が見られた。すなわち、PCRの前段階で用いる培地としてはSI培地よりも改良培地の方が優れていることが明らかになった。

【0043】(3) 液体試料中のL. 属細菌の検出
伏見1-6株を10%エタノールを含むSI液体培地15mlで30°C、2日間培養した。この培養液中の菌体数を血球計算盤にて計数後、10%アルコール濃度の純米酒で希釈し、300μl中に0、0.1、1、10、100個の菌数になるよう各サンプルを調製した。次に、各サンプル300μlを、直径2.5mm、孔径0.45μmのデュラポアメンブランフィルターを用いて吸引ろ過して菌体をフィルター上に捕獲した。次に、該フィルターを1.5ml容マイクロチューブ内で0.4mlの改良培地に浸し、30秒間かくはんした後そのまま30°Cで24時間培養した。次に、該培養液をフィルター付遠心チューブスプレック(SUPREC)-01(宝酒造社)に移し、5000rpmで1分間遠心し、増幅した菌体をフィルター上に捕獲した。

【0044】次に、0.4mlの滅菌蒸留水をスプレック *50

*-01のフィルター上に添加し、5000rpmで1分間遠心し、菌体を洗浄した。次に、スプレック-01のフィルター上に0.1mg/mlプロティナーゼKを含むPCR用緩衝液[10mMトリス-HCl pH8.3、50mM KC1、1.5mM MgCl₂、0.001%(W/V)ゼラチン]78.5μlを加えて懸濁後0.5ml容のマイクロチューブに移し、ミネラルオイル60μlを重層後、65°Cで60分間処理し、更に99°Cで10分間処理して、菌体を破壊し、DNAを露出させた。一方、比較対照として0.4mlの滅菌蒸留水で洗浄する工程を省略するサンプルも同時に調製した。

【0045】次に、各サンプルに21.5μlのPCR反応液[50mMトリス-HCl pH8.3、250mM KC1、7.5mM MgCl₂、0.005%(W/V)ゼラチン、1mM dUTP、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、1μM LAU-1プライマー、1μM プライマー、0.125U/μlアンブリタック(Ampri Tag)、0.005U/μl UNG)を加えDNAサーマルサイクラーにてPCRを行った。プライマーとしては配列表の配列番号24で示されるLAC3Rを新たに作成して使用した。PCRの条件は、45°Cで10分、95°Cで10分を1サイクル、更に94°Cで0.5分、55°Cで1分、72°Cで1分のサイクルを40サイクル行った。反応後、反応液の10μlをヌシープ3:1アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムプロマイドで染色して増幅されたDNAを検出した。その結果、洗浄工程を入れた場合は300ml中に

1、10、100個のL. 属細菌を含む各サンプルで約170bpの増幅産物が認められ、L. 属細菌を検出することができた。一方、洗浄工程を省略した対照はいずれのサンプルでも増幅産物が認められず、L. 属細菌を検出できなかった。また、別のL. 属細菌N5株についても全く同様の結果であった。

【0046】(4) 新しいプライマーを用いた火落菌検出

更に高感度で高精度な火落菌検出を目的として表7に示すLA1198(配列番号22)、LAF3R(配列番号23)、の各プライマーを作成した。次に表7に示すそれぞれの火落菌について、対応するプライマーとLAU-1のプライマー対で各火落菌のゲノムDNA1ngを鋳型としてPCRを行った結果、すべての火落菌でLAU-1とLAU3Rのプライマー対の場合よりも効率よく増幅された。また、それぞれの火落菌について、これらのプライマーとLAU-1のプライマー対で実施例1-(3)と同様にして液体試料中の火落菌を検出した結果、いずれも300ml中に1個の火落菌でも検出することができた。更に、LA1198、LAM3R、LAF3R、LAC3Rの4種のプライマーを混合したものを

用いた場合も、同様に各火落菌を効率よく検出することができた。

【0047】

【発明の効果】本発明により、L. 属細菌、特に火落菌の迅速かつ高感度な検出方法が提供された。

【0048】

【配列表】

【0049】配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA 20

【0050】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

GTGCGGCTGG ATCACCTCCT 20

【0051】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGATA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTTAGGTAAC 60

TTTGAGGCC TGCGCCTAA GGTGGGACAG ATGATTAGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC 120

CGTAGGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA AAAATTCGAA AACCTACAC 180

AATTAAAGTC TTGTTTAGTT TTGAGAGTTT TACTCTCAAT ACTTTCTCT TTGAAAACTA 240

GATAATATTA TTTCTGTAT TAATTATATT TTAATTATAA TTTAACCGA GAAATAACCA 300

CTACGTTATT TGAGTTTTT AAAATAGTTT AAATCGCAA TACTCAATAA CTTACATCAC 360

GAAGTGTGATGC AGGTAAAGTT ATTAAGGGCG CATGGTGAAT GCCTGGTAC TAGGAGCCGA 420

TGAAGGACGG AACTAACACC GATATGTTTC GGGGAGCTGT ACGTAAGCTT TGATCCGGAG 480

ATTCGGAAT GGGGAAACCC AATCATCTTA GTCGATGATT GCTCGACAGT GAATTCACTG 540

【0054】配列番号：6

配列の長さ：585

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacillus heterohiochii)

* アンチセンス：YES

配列：

CTCCTAGTGC CAAGSCATYC 20

【0052】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

10 アンチセンス：YES

配列：

TCCGGGTACT TAGATGTTTC 20

【0053】配列番号：5

配列の長さ：540

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

20 生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacillus heterohiochii)

株名：JCM 1198

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillus homohiochii)

株名：JCM1199

配列の特徴：

1-155 16SrRNA をコードする領域

156-371 スペーサー領域

220 tRNAをコードする領域の挿入位置

30 372-540 23SrRNA をコードする領域

*

※株名：IF013118, IF013119

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillus homohiochii)

株名：IF013120, IF013121

配列の特徴：

1-162 16SrRNA をコードする領域

163-370 スペーサー領域

277 tRNAをコードする領域の挿入位置

※50 371-585 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GCCGGATAAC 60
 CTAGTTACT AGGAGTCAGC CGTCTAAGGT GGGACAAATG ATTAGGGTGA AGTCGTAACA 120
 AGGTAGCCG AGGAGAACCT GCGGCTGGAT CACCTCCTT CTAAGGAAAA AAAGCGAACG 180
 TGACGGAGAG TAGGAGACTA CTAAGAGAAG TCAGTGAAGC AAACGGAAGC ACACGAAAGA 240
 GACTTTGTTT AGTTTGAGG GTAGTACCTC AAGAAAAGTT AGTACATTGA AAACTGAATA 300
 TAATCCAAT AAAAACCGAG ACAATCATTG AAGAACAGAT TGTAGAGCGA CCGAGAACAG 360
 CGATCTTAAA GTAAGGTCAA GTAGACAAGG GCGCACGGTG AATGCCTAGG CACTAGCAGC 420
 CGAAGAAGGA CGTGACGAAC TACGAAAAGC TTCGGGGAGT TGTAAAGTAAA CTAAGATCCG 480
 GAGATGTCCA AATGGGGAAA CCCAATGCAG TGATGCATTA TTACTAGCCG AATAGATAGG 540
 CTGGTAAAGG AAGACCGAGT GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CGGA 585

【0055】配列番号：7

配列の長さ：574

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ジャボニカス (*Lactobacillus* *)

* s japonicus)

株名：IAM10688

配列の特徴：

1-155 16SrRNAをコードする領域

156-358 スペーサー領域

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

359-574 23SrRNAをコードする領域

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC 60
 TTTAGGAAC CAGCCGCTA AGGTGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
 CCGTAGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA ATATTACCGA AACCTACACA 180
 CGCGTCGAAA CTTTGTAG TTTTGAGAGA TTTAACTCTC AAAACTTGT CTTTGAAAAC 240
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTTGAGTTT 300
 TTTATTGAAG TTTAATTATC GCTAAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480
 GCAACCCAGC AGTTTAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

【0056】配列番号：8

配列の長さ：574

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス プランタルム (*Lactobacillus* *)

※ s plantarum)

株名：IAM1216

配列の特徴：

1-155 16SrRNAをコードする領域

156-358 スペーサー領域

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

359-574 23SrRNAをコードする領域

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC 60
 TTTAGGAAC CAGCCGCTA AGGTGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
 CCGTAGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA ATATTACCGA AACCTACACA 180
 CGCGTCGAAA CTTTGTAG TTTTGAGAGA TTTAACTCTC AAAACTTGT CTTTGAAAAC 240
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTTGAGTTT 300
 TTTATTGAAG TTTAATTATC GCTAAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480
 GCAACCCAGC AGTTTAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

【0057】配列番号：9

★50★配列の長さ：588

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ

カゼイ

* (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*)

株名：IF03532

配列の特徴：

1-158 16SrRNA をコードする領域

159-375 スペーサー領域

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

* 376-588 23SrRNA をコードする領域

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
CTTTAGGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
ACGGAAACCT GCACACACGA AACTTGTGTT AGTTTGAGG GGATCACCCCT CAAGCACCCT 240
AACGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAAATCTG GATATCATTG TATTAATTGT TTTAAATTGC 300
CGAGAACACA CGCTATTGTG ATGAGTTCT GAAAAAGAAA TTGCGATCGC ATAACCGCTG 360
ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GGCGCACGGT GGATGCCCTG GCACTAGGAG 420
CCGATGAAGG ACGBAACTAA TACCGATATG CCTCGGGGAG CTATAAGTAA GCTTGATCC 480
GGAGATTTCG GAATGGGAA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTGTCA GTGAATACAT 540
AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACCTGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

```

【0058】配列番号：10

※ カゼイ

配列の長さ：588

20 (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*)

配列の型：核酸

株名：IF03533

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

1-158 16SrRNA をコードする領域

配列の種類：genomic DNA

159-375 スペーサー領域

起源：

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ

* 376-588 23SrRNA をコードする領域

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
CTTTAGGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
ACGGAAACCT GCACACACGA AACTTGTGTT AGTTTGAGG GGATCACCCCT CAAGCACCCT 240
AGCGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAAATCTG GATATCATTG TATTAATTGT TTTAAATTGC 300
CGAGAACACA CGCTATTGTG ATGAGTTCT GAAAAAGAAA TTGCGATCGC ATAACCGCTG 360
ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GGCGCACGGT GGATGCCCTG GCACTAGGAG 420
CCGATGAAGG ACGBAACTAA TACCGATATG CCTCGGGGAG CTATAAGTAA GCTTGATCC 480
GGAGATTTCG GAATGGGAA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTGTCA GTGAATACAT 540
AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACCTGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

```

【0059】配列番号：11

★ s sp.)

配列の長さ：414

株名：IF03934

配列の型：核酸

40 配列の特徴：

鎖の数：二本鎖

1-156 16SrRNA をコードする領域

トポロジー：直鎖状

157-370 スペーサー領域

配列の種類：genomic DNA

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

起源：

371-414 23SrRNA をコードする領域

生物名：ラクトバチルス スピーシーズ (*Lactobacillus* ★)

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60
CTTCGGGAGT CAGCCGTCTA AGGTGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
CCGTAGGAGA ACCTGCGGCT GGATCACCTC CTTTCTAAGG AAATACCGA GGCTACACAT 180
ACTTGTGAA ACAATGTTCA GTTTGAGGG GCGAACCTCT CTAAACTGT TCTTGAAAA 240

```

CTAGATATT TCAATTATT TCCTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACGTG 300
 GTATTTTGA GTTTTTAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTGAG CGATCACGAA 360
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGAGC CTTGGTACTA GGAG 414

【0060】配列番号：12

配列の長さ：585

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ブレビス (Lactobacillus br *)

* evis)

株名：IF013110

配列の特徴：

1-156 16SrRNAをコードする領域

157-370 スペーサー領域

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

10 371-585 23SrRNAをコードする領域

配列：

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCACGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60
 CTCGGGAGT CAGCCGTCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAGGTAG 120
 CCGTAGGAGA ACCTGCGGC GGATCACCTC CTTCTAAGG AATATACGGA GGCTACACAT 180
 ACTTGTGAA ACAATGTTCA GTTTGAGGG GCTTACCTCT CTAAACTTGT TCTTGAAAA 240
 CTAGATATT TCAATTATT TCCTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACGTG 300
 GTATTTTGA GTTTTTAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTGAG CGATCACGAA 360
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGATG CCTTGGTACT AGGAGCCGAT 420
 GAAGGACGGG ACTAACACCG ATATGCTCG GGGAGCTGTA CGTAAGCTT GATCCGGAGA 480
 TTTCCGAATG GGGAAACCCA ATCATCTTA CCGATGATTA CAACTGATG AATACATAGT 540
 CAAGTTGAGG CAGACGTGGG GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CCCGA 585

【0061】配列番号：13

配列の長さ：286

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

※生物名：ラクトバチルス (Lactobacillus)

株名：F-1

配列の特徴：

1-20 16SrRNAをコードする領域

21-241 スペーサー領域

86 tRNAをコードする領域の挿入位置

※ 242-286 23SrRNAをコードする領域

配列：

GGCTGGATCA CCTCCTTCT AAGGAAAATT CGGAAACCTA CACAATGTCG AAAGTTTGT 60
 TCACTTTGA GAGGTCTACT CTCAAACTG GTTCTTGAA AACTAGATAA TATTAATT 120
 CTGTAATT TGTAAATTGGA TATAATCCAA TTCAACCGA GAACACCCG TTATTTGAG 180
 TTTGTTAACT AAGTAAAAAA TCGCAAATAC TCAATTAAC AAAGTATCCG TAGGATACTT 240
 AGGTTAAGTT ATCAAGGGCG CATGGTGAAT GCCTTGGCAC TAGGAG 286

【0062】配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：YES

配列：

CCTGCATCAC TTCGTGATGT 20

【0063】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★アンチセンス：YES

配列：

GCTCTACAAT CTGTTCTTC 20

【0064】配列番号：16

40 配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：YES

配列：

TTTACCTAAC GGTAAATGCG 20

【0065】配列番号：17

配列の長さ：20

★50 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 GTACTGACTT GCGTCAGCGG 20
 【0066】配列番号：18
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 GGTCACCTCG TGATCGTCAA 20
 【0067】配列番号：19
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：NO
 配列：
 AATTGGAAA CCTACACAAT 20
 【0068】配列番号：20
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：NO
 配列：
 ATCACCTCCT TTCTAAGGAA 20
 【0069】配列番号：21
 配列の長さ：20

* 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 AAAAACGGG GTGTTCTCGG 20
 【0070】配列番号：22
 配列の長さ：22
 10 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 TAACGTAGTG GTTATTCTC GG 22
 【0071】配列番号：23
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 20 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 CAAATACGCT GTGTTCTCGG 20
 【0072】配列番号：24
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 30 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 AAATAACGGG GTGTTCTCGG 20

*

フロントページの続き

(72)発明者 富士野 公也
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
 株式会社中央研究所内

※(72)発明者 加藤 郁之進
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
 株式会社中央研究所内